

BMBF-Förderprogramm „Innovative Regionale Wachstumskerne“

BioOK – Entwicklung von Zulassungs- und Überwachungsverfahren für  
transgene Nutzpflanzen

Verbundprojekt 4:

Analyse und Bewertung der Umweltrisiken transgener Nutzpflanzen

Teilprojekt 4A:

Entwicklung eines schnellen *in vivo* Verfahrens zur Detektion geringer Einflüsse Transgen-kodierter Proteine auf Mikroorganismen und Stoffflüsse im Boden: Produktion transgener Wurzeln, TP4A

## **SCHLUSSBERICHT**

Antragsteller: Universität Rostock  
Ausführende Stelle: Universität Rostock  
Förderkennzeichen: 03WKS04A  
Förderzeitraum: 01.07.2005 - 31.06.2008  
Projektleiter: Prof. Dr. rer. nat Inge Broer  
Bearbeiter: Patricia Horn  
Verfasser: Prof. Dr. rer. nat. Inge Broer  
Patricia Horn

Rostock, 23.12.2008

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03WKS04A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>I Kurzdarstellung</b>	<b>7</b>
<b>1 Aufgabenstellung</b>	<b>7</b>
<b>2 Voraussetzungen unter denen das Projekt durchgeführt wurde</b>	<b>8</b>
<b>3 Planung und Ablauf des Vorhabens</b>	<b>9</b>
<b>4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde</b>	<b>12</b>
<b>5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	<b>16</b>
<b>II Eingehende Darstellung</b>	<b>17</b>
<b>1 Erzielte Ergebnisse und Gegenüberstellung mit Zielstellung</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Etablierung eines Klonierungssystems zur schnellen Integration unterschiedlicher Zielgene in einen Vektor mit hoher Expression des Zielgens</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Molekulare Analysen</b>	<b>20</b>
1.2.1 <i>Vicia hirsuta</i>	20
1.2.2 Kartoffel	24
<b>1.3 Herstellung kombinierter Pflanzen und Analyse der Repräsentativität</b>	<b>25</b>
1.3.1 Optimierung des <i>Vicia hirsuta</i> -Systems und Analyse der Repräsentativität	25
1.3.2 Übertragung des Systems der kombinierten Wicke auf Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> )	28
<b>1.4 Übertragung kombinierter Pflanzen auf nicht sterile Testböden</b>	<b>30</b>
1.4.1 <i>Vicia hirsuta</i>	30
1.4.2 Kartoffel	33
<b>1.5 Auswirkung des transgen kodierten Proteins auf die Nodulation der Wickenpflanzen als Teil der symbiontischen Rhizosphären-Mikroorganismen-Interaktion</b>	<b>35</b>
<b>2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises</b>	<b>44</b>
<b>3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten</b>	<b>44</b>

<b>4</b>	<b>Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Während der Durchführung bekanntgewordener technischer Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>III</b>	<b>Kurzfassung (Berichtsblatt)</b>	<b>50</b>

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Für die Herstellung kombinierter Pflanzen ( <i>V.hirsuta</i> und <i>S.tuberosum</i> ) verwendete Bakterienstämme.....	18
Tabelle 2: Anteil der auf Wurzeln, bei denen auf Protein- bzw. RNA-Ebene das transgen kodierte Protein in Abhängigkeit vom Integrationsvektor nachweisbar ist. ....	22
Tabelle 3: Optimierung der Kanamycin (Km) Konzentration für die Selektion haariger Wurzeln an kombinierten Kartoffeln .....	25
Tabelle 4: Häufigkeit der Induktion transgener Wurzeln an den 4 verschiedenen Kartoffelsorten Albatros, Desirée, Saturna und Sabina.....	30
Tabelle 5: Übertragung kombinierter Wicken in Erde .....	32
Tabelle 6: Zusammenfassung der Hemmhofstests.....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vektorkarte des optimierten hochexprimierenden Vektors pAFM .....	19
Abbildung 2: Vergleich der detektierbaren GUS-Aktivität von Wurzeln transgener GUS-exprimierender Pflanzen mit unterschiedlichen GUS-Expressionshöhen mit und ohne Vakuuminfiltration des Reagenz. ....	21
Abbildung 3: Gehalt an transgenkodiertem Protein in den Wurzeln der CombiSart-Gefäße .....	23
Abbildung 4: Auswirkung unterschiedlicher Saatguteinwaagen auf die Keimrate (%) des Wickensaatgutes .....	26
Abbildung 5: Einfluß der Stickstoffkonzentration im Wurzelinduktionsmedium auf:.....	27
Abbildung 6: Kein wiederholbarer, signifikanter Einfluss der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB, Cyanophycin) auf die Induktion transgener Wurzeln an <i>Vicia hirsuta</i> -Keimlingen: .....	28
Abbildung 7: Keine Induktion von Wurzelwachstum an Kartoffelstecklingen (a) nach Verletzung und anschließender Injektion des Bakterienanzuchtmediums YEB (links) im Vergleich zu (b) einer <i>A.rhizogenes</i> Bakteriensuspension in YEB mit (rechts). ....	29
Abbildung 8: keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) auf die Wurzelmasse von <i>V.hirsuta</i> -Pflanzen in CombiSart-Gefäßen. ....	33

Abbildung 9: schematisches Pipettierschema zur Untersuchung der Wirkung von transgenem Kartoffelextrakt auf das Rhizobienwachstum mittels Hemmhoftest. ....	37
Abbildung 10: Keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des Lysozyms auf die Nodulation von <i>V.hirsuta</i> Pflanzen .....	38
Abbildung 11: Keine Auswirkung der transgen kodierten (a) Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des (b) Lysozyms auf die Effektivität der Stickstofffixierung, gemessen anhand ganzer Pflanzen im GC. ....	40

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
<i>A.rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
ARDRA	' <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> '
Bt-Toxin	Toxin dessen Gen vom Bakterium <i>Bacillus thuringiensis</i> stammt
cDNA	' <i>complementary DNA</i> ', ist eine DNA, die mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wurde
cm	Zentimeter
CTB	Choleratoxin B
ctxB	Kodierbereich für Choleratoxin B
DGGE	' <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> '
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acids)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
<i>et al.</i>	<i>und andere (et alii)</i>
etc.	et cetera
Fa.	Firma
GC	Gaschromatograph
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Kommanditgesellschaft
GUS	β-Glucuronidase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GVP	gentechnisch veränderte Pflanze
HEW	Hühnereiweiß
Kn	Kanamycin
KMU	Kleine und mittlere Unternehmen
l	Liter
MCS	' <i>multiple cloning site</i> '
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MS	Murashige & Skoog
N	Sickstoff
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ammoniumnitrat
niV	nahe isogene Variante
NORIKA	Nordring- Kartoffelzucht- und Vermehrungs- GmbH Groß Lüsewitz
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
pat	Phosphinothricin-N-Acetyltransferase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PLFA	' <i>Phospholipid fatty acids</i> '
PsbY	Transitpetid für den Import in Chloroplasten
<i>Rh.leguminosarum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
S.tuberosum	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)
STZ	Steinbeis-Transferzentrum